

(12) DEMANDE INTERNATIONALE PUBLIÉE EN VERTU DU TRAITÉ DE COOPÉRATION
EN MATIÈRE DE BREVETS (PCT)

(19) Organisation Mondiale de la Propriété
Intellectuelle
Bureau international



Rec'd PCT/PTO 13 MAR 2005



(43) Date de la publication internationale
1 avril 2004 (01.04.2004)

PCT

(10) Numéro de publication internationale
WO 2004/027068 A3

(51) Classification internationale des brevets⁷ :
C12N 15/70, C07K 14/18

(21) Numéro de la demande internationale :
PCT/FR2003/002763

(22) Date de dépôt international :
19 septembre 2003 (19.09.2003)

(25) Langue de dépôt : français

(26) Langue de publication : français

(30) Données relatives à la priorité :
02/11676 20 septembre 2002 (20.09.2002) FR

(71) Déposant (pour tous les États désignés sauf US) :
CENTRE NATIONAL DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE [FR/FR]; 3, rue Michel Ange, F-75794 Paris Cedex 16 (FR).

(72) Inventeurs; et

(75) Inventeurs/Déposants (pour US seulement) : FALSON, Pierre [FR/FR]; 5, avenue Valioud, F-69110 Sainte Foy les Lyon (FR). PENIN, François [FR/FR]; 20, avenue des Platanes, F-69150 Decines Charpieu (FR). MONTIGNY, Cédric [FR/FR]; Résidence La Cilof, Bât. K., Route de Chateaufort, F-91190 Gif sur Yvette (FR).

(74) Mandataire : AUDIER, Philippe; c/o Brevatome, 3, rue du Docteur Lancereaux, F-75008 Paris (FR).

(81) États désignés (national) : AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW.

(84) États désignés (régional) : brevet ARIPO (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), brevet eurasien (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), brevet européen (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IT, LU, MC, NL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), brevet OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Publiée :

- avec rapport de recherche internationale
- avant l'expiration du délai prévu pour la modification des revendications, sera republiée si des modifications sont reçues

(88) Date de publication du rapport de recherche internationale: 22 avril 2004

En ce qui concerne les codes à deux lettres et autres abréviations, se référer aux "Notes explicatives relatives aux codes et abréviations" figurant au début de chaque numéro ordinaire de la Gazette du PCT.

(54) Title: SYSTEMS FOR EXPRESSING TOXIC PROTEINS, VECTORS AND METHOD OF PRODUCING TOXIC PROTEINS

(54) Titre : SYSTEMES D'EXPRESSION DE PROTEINES TOXIQUES, VECTEURS ET PROCEDE DE FABRICATION DE PROTEINES TOXIQUES

(57) Abstract: The invention relates to a system for expressing toxic proteins, an expression vector comprising the aforementioned system, a prokaryote cell transformed by the system and a method of synthesising a toxic protein using said expression system. Said expression system is characterised in that it comprises the following successive sequences in direction 5' 3', namely a nucleotide sequence coding for dipeptide Asp-Pro and a nucleotide sequence coding for a toxic protein. In a particularly preferable mode, the expression system also comprises, upstream of the Asp-Pro sequence, a nucleotide sequence coding for a soluble protein. The inventive expression system can be used to construct an expression vector which can be used to transform a prokaryote cell such as *E. coli*, e.g. in a toxic protein synthesis method.

(57) Abrégé : La présente invention se rapporte à un système d'expression de protéines toxiques, à un vecteur d'expression comprenant ce système, à une cellule procaryote transformée par ce système, ainsi qu'à un procédé de synthèse d'une protéine toxique utilisant ce système d'expression. Le système d'expression de l'invention se caractérise en ce qu'il comprend successivement, dans le sens 5'-3', une séquence nucléotidique codant pour le dipeptide Asp-Pro et une séquence nucléotidique codant pour une protéine toxique. Selon un mode particulièrement préféré de l'invention, le système d'expression comprend en outre, en amont de la séquence Asp-Pro, une séquence nucléotidique codant pour une protéine soluble. Le système d'expression de l'invention permet de construire un vecteur d'expression utile pour la transformation d'une cellule procaryote telle que *E. coli*, par exemple dans un procédé de synthèse de la protéine toxique.

WO 2004/027068 A3

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PCT/FR 03/02763

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
IPC 7 C12N15/70 C07K14/18

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC 7 C12N C07K

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

MEDLINE, EPO-Internal, CHEM ABS Data, WPI Data, EMBASE

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WANG YONGBAO ET AL: "A unique approach for high level expression and production of a recombinant cobra neurotoxin in Escherichia coli." JOURNAL OF BIOTECHNOLOGY. NETHERLANDS 11 APR 2002, vol. 94, no. 3, 11 April 2002 (2002-04-11), pages 235-244, XP001159705 ISSN: 0168-1656	1,2,8,9, 12,13, 15,17, 19-22
Y	the whole document	2-7,10, 11,14, 16,18, 23-26

-/--

☒ Further documents are listed in the continuation of box C.

☐ Patent family members are listed in annex.

* Special categories of cited documents:

- *A* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- *E* earlier document but published on or after the international filing date
- *L* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- *O* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- *P* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

- *T* later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
- *X* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
- *Y* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.
- * & * document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

3 March 2004

Date of mailing of the international search report

16/03/2004

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Gurdjian, D

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PCT/FR 03/02763

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	<p>CICCAGLIONE A R ET AL: "Hepatitis C virus E1 protein induces modification of membrane permeability in E. coli cells." VIROLOGY. UNITED STATES 10 OCT 1998, vol. 250, no. 1, 10 October 1998 (1998-10-10), pages 1-8, XP001159707 ISSN: 0042-6822 cited in the application abstract; figures 1-3</p>	<p>2-7,10, 11,14, 16,18, 23-26</p>
A	<p>CICCAGLIONE A R ET AL: "Secretion and purification of HCV E1 protein forms as glutathione-S-transferase fusion in the baculovirus insect cell system." VIRUS RESEARCH. NETHERLANDS JUN 1998, vol. 55, no. 2, June 1998 (1998-06), pages 157-165, XP001159708 ISSN: 0168-1702 cited in the application abstract; figure 1</p>	<p>10,11, 16,23-26</p>
A	<p>DATABASE TREMBL 'Online! 1 November 1996 (1996-11-01) OKAMOTO,H ET AL.: "NS2A protein (Genome polyprotein) (Fragment)." retrieved from EBI Database accession no. Q81569 XP002244032 the whole document</p>	<p>5,6,10, 11,14, 16,23-26</p>
A	<p>DATABASE TREMBL 'Online! 19 December 2001 (2001-12-19) SARRAZIN,C ET AL.: "Envelope protein (Genome polyprotein) (Fragment). E2" retrieved from EBI Database accession no. Q91EE4 XP002244033 the whole document</p>	<p>5,6,10, 11,14, 16,23-26</p>

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Demande internationale No

PCT/FR 03/02763

A. CLASSEMENT DE L'OBJET DE LA DEMANDE
CIB 7 C12N15/70 C07K14/18

Selon la classification internationale des brevets (CIB) ou à la fois selon la classification nationale et la CIB

B. DOMAINES SUR LESQUELS LA RECHERCHE A PORTE

Documentation minimale consultée (système de classification suivi des symboles de classement)

CIB 7 C12N C07K

Documentation consultée autre que la documentation minimale dans la mesure où ces documents relèvent des domaines sur lesquels a porté la recherche

Base de données électronique consultée au cours de la recherche internationale (nom de la base de données, et si réalisable, termes de recherche utilisés)

MEDLINE, EPO-Internal, CHEM ABS Data, WPI Data, EMBASE

C. DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS

Catégorie *	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
X	WANG YONGBAO ET AL: "A unique approach for high level expression and production of a recombinant cobra neurotoxin in Escherichia coli." JOURNAL OF BIOTECHNOLOGY. NETHERLANDS 11 APR 2002, vol. 94, no. 3, 11 avril 2002 (2002-04-11), pages 235-244, XP001159705 ISSN: 0168-1656	1,2,8,9, 12,13, 15,17, 19-22
Y	le document en entier	2-7,10, 11,14, 16,18, 23-26

☒ Voir la suite du cadre C pour la fin de la liste des documents

☐ Les documents de familles de brevets sont indiqués en annexe

* Catégories spéciales de documents cités:

- *A* document définissant l'état général de la technique, non considéré comme particulièrement pertinent
- *E* document antérieur, mais publié à la date de dépôt international ou après cette date
- *L* document pouvant jeter un doute sur une revendication de priorité ou cité pour déterminer la date de publication d'une autre citation ou pour une raison spéciale (telle qu'indiquée)
- *O* document se référant à une divulgation orale, à un usage, à une exposition ou tous autres moyens
- *P* document publié avant la date de dépôt international, mais postérieurement à la date de priorité revendiquée

- *T* document ultérieur publié après la date de dépôt international ou la date de priorité et n'appartenant pas à l'état de la technique pertinent, mais cité pour comprendre le principe ou la théorie constituant la base de l'invention
- *X* document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme nouvelle ou comme impliquant une activité inventive par rapport au document considéré isolément
- *Y* document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme impliquant une activité inventive lorsque le document est associé à un ou plusieurs autres documents de même nature, cette combinaison étant évidente pour une personne du métier
- *Z* document qui fait partie de la même famille de brevets

Date à laquelle la recherche internationale a été effectivement achevée

3 mars 2004

Date d'expédition du présent rapport de recherche internationale

16/03/2004

Nom et adresse postale de l'administration chargée de la recherche internationale
Office Européen des Brevets, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax (+31-70) 340-3016

Fonctionnaire autorisé

Gurdjian, D

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Demande internationale No

PCT/FR 03/02763

C.(suite) DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS

Catégorie	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
Y	<p>CICCAGLIONE A R ET AL: "Hepatitis C virus E1 protein induces modification of membrane permeability in E. coli cells." VIROLOGY. UNITED STATES 10 OCT 1998, vol. 250, no. 1, 10 octobre 1998 (1998-10-10), pages 1-8, XP001159707 ISSN: 0042-6822 cité dans la demande abrégé; figures 1-3</p>	<p>2-7,10, 11,14, 16,18, 23-26</p>
A	<p>CICCAGLIONE A R ET AL: "Secretion and purification of HCV E1 protein forms as glutathione-S-transferase fusion in the baculovirus insect cell system." VIRUS RESEARCH. NETHERLANDS JUN 1998, vol. 55, no. 2, juin 1998 (1998-06), pages 157-165, XP001159708 ISSN: 0168-1702 cité dans la demande abrégé; figure 1</p>	<p>10,11, 16,23-26</p>
A	<p>DATABASE TREMBL 'en ligne! 1 novembre 1996 (1996-11-01) OKAMOTO,H ET AL.: "NS2A protein (Genome polyprotein) (Fragment)." retrieved from EBI Database accession no. Q81569 XP002244032 le document en entier</p>	<p>5,6,10, 11,14, 16,23-26</p>
A	<p>DATABASE TREMBL 'en ligne! 19 décembre 2001 (2001-12-19) SARRAZIN,C ET AL.: "Envelope protein (Genome polyprotein) (Fragment). E2" retrieved from EBI Database accession no. Q91EE4 XP002244033 le document en entier</p>	<p>5,6,10, 11,14, 16,23-26</p>